Über hydrolysierbare ninhydrinpositive Bestandteile des Myokards

SIEGFRIED DONHAUSER

1960

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK · 8 München 13 · Telefon 597 397 [52 46 07]

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

ÜBER HYDROLYSIERBARE NINHYDRINPOSITIVE BESTANDTEILE DES MYOKARDS.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Siegfried D o n h a u s e r

aus Warngau / Obb.

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. Seitz
Dekan:	Professor Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 7. 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Einleitung

Die klassischen Methoden der Trennung von Aminosäuren und Peptiden in einer Lösung stellen nach wie vor die Chromatographie -sei es als einfache Papierchromatographie oder als Jonenaustauscherchromatographie- und die Elektrophorese dar. Diese Methoden stehen somit auch im Vordergrund bei der Erforschung der Zusammensetzung von Gewebsflüssigkeiten und Organhomogenaten bzw. -filtraten. So benützt z.B. DE GUGLIELMONE (5) bei seinen Untersuchungen der freien Aminosäuren in den verschiedenen Teilen des Rattenhirns die Papierchromatographie, während BISERTE (1) bei seinen Untersuchungen der verschiedenen Organe als Methode der Wahl eine Kombination von Papierchromatographie und Niederspannungselektrophorese beschreibt. Allerdings sind die meisten derartigen Untersuchungen nur auf die freien Aminosäuren beschränkt und vernachlässigen zumeist die Frage der Aufklärung weiterer auftretender Substanzen, wie der niedermolekularen Peptide oder der Amine.

Mit der Hochspannungselektrophorese ist uns nun eine weitere neuere Möglichkeit gegeben, welche die Untersuchungen der in den einzelnen Organen vorkommenden Substanzen zu erleichtern und zu vereinfachen scheint.

Anliegen dieser Arbeit ist es, den Herzmuskel des Kalbes auf seine ninhydrinpositiven Substanzen zu untersuchen, welche nicht mit den normalerweise frei vorkommenden Aminosäuren identisch sind, also vor allem Oligopeptide und biogene Amine. Wir versuchen, diese Fraktionen im Hochspannungs elektropherogramm zu lokalisieren und nach Möglichkeit zu identifizieren. Mit den Ergebnissen stellen wir anschliessend einen Vergleich der "Organspektren" des Herz- und Skelettmuskels an.

Methodik und verwendete Apparate

I. Gewinnung des Materials:
Möglichst unmittelbar nach der Schlachtung des Kalbes wurde das Herz ziemlich hoch an der Aorta abgeschnitten und aus dem Situs gelöst. Durch sofortige Durchspülung mit lauwarmer Tyrodelösung gelang es, das Herz noch einige Zeit schlagfähig zu erhalten, sodass durch die Eigenkontraktion mit Unterstützung durch eine manuelle Massage das Blut weitestgehend aus Vorhöfen, Kammern und Gefässen entfernt werden konnte. Anschliessend wurde das Herz von seinen Anhangsteilen, wie Pericard, Gefässen, Fett usw. freipräpariert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die linke Herzkammer wurde abgetrennt und grob zerkleinert. Dann wurde das Gewebe mit Aqua bidest im Verhältnis 1:2 versetzt, 2 Minuten homogenisiert und über Nacht, etwa 15-2o Stunden, bei o Grad Celsius zur Extraktion stehengelassen.

Das Homogenat wurde 2o Minuten bei 34oo r/min und o Grad Celsius zentrifugiert, der Überstand abgegossen und zur weiteren Bearbeitung aufgehoben. Das Sediment wurde mit Aqua bidest im Verhältnis 1:1 aufgefüllt und verrührt, 3o Minuten stehengelassen und anschliessend wieder unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, das Sediment verworfen.

Zur Einengung des Materials wurde das Ultrafilter LKB 63oo A der Firma LKB-Produkter AB verwendet. Es besteht aus einem Kunststoffgerippe, über welches ein Dialyseschlauch gezogen wird, der unten doppelt verknotet, oben durch einen Gummiring luftdicht verschlossen wird. Ein Gummistopfen mit einem Evakuierungsrohr verschliesst das offene Ende des Gerippes. Der Apparat wird in den Extrakt eingetaucht und an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Lösungsmittel und gelöste Stoffe unter einem Molekulargewicht von ca. 3o ooo diffundieren in das Innere des Schlauches. Der ganze Vorgang spielt sich im eisgekühlten Wasserbad, also bei o Grad Celsius ab. Vor und nach der Ultrafiltration wurde der Eiweissgehalt im Extrakt mit Hilfe der Biuretmethode bestimmt. Bei einem Eiweissgehalt von ungefähr 4 gr% wurde die Einengung abgebrochen.

Das gewonnene Material wurde gefriergetrocknet, nach der Trocknung sofort abgewogen und in mehrere Reagenzgläser verteilt. Diese wurden luft- und wasserdicht verschlossen und bei Temperaturen von

ca. minus 15 Grad Celsius aufbewahrt.

Zur Hydrolyse wurde ein Teil des gewonnenen Materials in Aqua bidest aufgelöst. Als schonendste und einfachste Methode erschien die Säurehydrolyse. Nach REES (8) wird dabei nur Tryptophan völlig zerstört, Serin und Threonin erfahren einen Verlust bis zu 1o %,Glutamin verwandelt sich in Glutaminsäure und Asparagin in Asparaginsäure. Bei der alkalischen Hydrolyse hingegen wird Cystin völlig, Serin und Threonin weitgehend zerstört und Arginin wandelt sich in Ornithin um. Mit der zweifachen Menge 6n HCl wurde im Rückflusskühler 24 Stunden bei etwa 16o Grad Celsius gekocht. Die verwendete Salzsäure wurde vorher 2 mal destilliert, da Schwermetalle Aminosäuren zerstören. Anschliessend wurde die Salzsäure mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wieder abdestilliert, der Rückstand mit möglichst geringen Mengen Aqua bidest aus dem Glaskolben gelöst und bei ca, minus 15 Grad Celsius aufbewahrt.

II. Trennungsmethode:

Zur Hochspannungselektrophorese wurde eine Apparatur (Firma Hölzel, München) verwendet, die von Dozent Dr. W. Zillig im Max-Planck-Institut für Biochemie in München entwickelt wurde. Sie erlaubt Spannungen von o bis 1o ooo Volt und Stromstärken bis zu 2oo mA. Ein Kühlaggregat gewährleistet die Ableitung einer Stromstärke von maximal 4oo Watt. Das Wärmegefälle zwischen Träger und Kühlmittel beträgt 2 bis 3 Grad Celsius, sodass man bei Temperaturen arbeiten kann, die dicht oberhalb des Gefrierpunktes liegen, ohne dass der Streifen einfriert.

Die Trennkammer besteht aus einer gekühlten Kupferplatte von 55 cm Länge und 45 cm Breite. An jedem Ende der Trennstrecke stehen zwei Glasgefässe zur Aufnahme des Puffergemisches. Sie sind durch Glas-U-Rohre, die ebenfalls mit Puffer gefüllt werden, miteinander verbunden. In die äusseren der beiden Gefässe ragen die Platinelektroden,während von den inneren der Puffer auf die Trägerstreifen übergeleitet wird. Diese Zuleitungen bestehen aus vier Schichten Filterpapier, die in Kunststoffhüllen eingeschlagen werden. Sie werden so eingelegt, dass sie zur Pufferwanne hin offen sind, während die verschlossene Kante auf den Trägerstreifen zu liegen kommt.

Die Papierbogen wurden auf die benötigte Länge und Breite zugeschnitten und die Auftragsstellen mit einem Bleistift eingezeichnet.

Diese wurden nach der zu erwartenden Wanderungsrichtung, die von der Art der elektrischen Ladung der einzelnen im Untersuchungsmaterial enthaltenen Moleküle abhängt, so entweder kathoden- oder anodenwärts gelegt, dass eine möglichst grosse Trennstrecke erreicht wurde. Anschliessend wurden die Streifen in eine Wanne mit dem verwendeten Puffer gelegt und 1o Minuten eingeweicht. Nach der Herausnahme wurden sie sorgfältig und gleichmässig zwischen zwei Bogen Filterpapier getrocknet, bis sie ihren Feuchtigkeitsglanz verloren hatten. Zum Auftragen des Materials wurden aus einem Kunststoffschlauch von 1 mm Durchmesser Pipetten hergestellt, die durch Aufsaugen eines Tropfens Wasser bekannter Menge geeicht wurden. Für jede der verwendeten Substanzen wurde eine eigene Pipette benützt. Etwas oberhalb der markierten Auftragsstelle wurde ein dickes Lineal unter das Papier gelegt, sodass sich diese auf der Schräge zwischen Lineal und Unterlage befand und so letztere nicht berührte. Dann wurde mit mehreren zügigen, kontinuierlichen Strichen, möglichst ohne an- und abzusetzen und ohne auf dem Papier zu kratzen oder zu tropfen, die gewünschte Menge des Materials aufgetragen. Exaktes Auftragen war die erste Voraussetzung, gute Auftrennungen und gute Bilder zu bekommen. Anschliessend wurde der behandelte Papierstreifen auf die von Kondenswasser getrocknete Kühlplatte der Hochspannungselektrophoreseapparatur gebracht und mit einem Kunststofflineal glattgestrichen. Nach Auflegen der Pufferüberleitungen wurde die Kühlkammer geschlossen, der Kammerdeckel gleichmässig festgeschraubt und die gewünschte Spannung und Stromstärke angelegt. Die gesamte Behandlung des Papieres wurde mit Handschuhen vorgenommen, um eine Verunreinigung durch Fingerabdrücke und dergleichen zu vermeiden.

Folgende Papiersorten fanden Verwendung:
Schleicher & Schüll Nr. 2o43 a und Nr. 2o43 b Mgl.

Nach Art des zu trennenden Materials und der Aufgabestellung wurden verschiedene Puffergemische verwendet. Für Übersichtspherogramme meist ein Gemisch aus Pyridin-Eisessig-Wasser im Verhältnis 1o:1oo:89o, welches ein pH von 3,6 aufwies. Zur Auftrennung der neutralen Fraktionen erwies sich ein Puffer mit dem pH 1,9, der aus Eisessig-Ameisensäure-Wasser im Verhältnis 12o:26:854 gemischt war, als sehr günstig. Leider zeigten sich bei diesem Puffer trotz exakter Auftragtechnik Schwanzbildungen bei den einzelnen Fraktionen. Nur bei Verwendung ganz geringer Mengen des aufgetragenen Materials konnten diese vermindert, nie aber

verhindert werden. Eigenartigerweise waren diese Schwanzbildungen bei hydrolysierten Extrakten geringer. Im basischen Bereich brachte der Pyridinpuffer mit dem pH 5,5, bestehend aus Pyridin-Essigsäure-Wasser im Verhältnis 9o:1o:9oo, die besten Auftrennungen.

Neben den verschiedenen Puffern war auch noch die Veränderung von Spannung und Laufzeit für eine gute Trennung auszunützen. So wurde meist mit 3oo Watt gearbeitet, während die Laufzeiten zwischen 45 und 18o Minuten variierten.

Die fertigen Streifen wurden bei 9o Grad Celsius im Brutschrank 3o Minuten getrocknet und anschliessend gefärbt. Dazu wurde folgendes Reagens benutzt: o,3 % Ninhydrin in 1 ml Pyridin, 1 ml Eisessig und 98 ml Aceton (im Folgenden PENA-Färbung). Durch diese Lösung wurde der Bogen 2 mal gezogen, abgestreift und dann 1o Minuten bei 7o Grad Celsius getrocknet. Dabei ergab sich eine Blau- bis Violettfärbung der Fraktionen auf ungefärbtem Untergrund. Leider verblassten die Pherogramme schon nach 24 bis 48 Stunden, sodass zu ihrer Aufbewahrung eine stabilere Färbung verwendet werden musste. Diese fand sich in einem Farbreagens, das aus o,4 gr Ninhydrin und o,2 gr Kobaltchlorid in 1oo ml Isopropylalkohol besteht (im Folgenden KNI-Färbung). Dadurch wird die Färbung in einen Metallkomplex übergeführt, sodass eine stabile, gleichmässige Rotfärbung auf ungefärbtem Untergrund entsteht.

III. Elution der einzelnen Fraktionen:

Zur Identifikation einzelner Fraktionen war es notwendig, diese aus dem Papier zu eluieren. Dazu wurde der nicht hydrolysierte Extrakt zunächst über die ganze Breite eines Bogens aufgetragen und das fertige Pherogramm getrocknet. Von dem ungefärbten Pherogramm wurden Randstreifen, die etwa o,5 cm von dem aufgetragenen Extrakt enthielten, abgeschnitten und gefärbt. So konnte die gesuchte Fraktion lokalisiert und auf dem ungefärbten Streifen markiert werden; anschliessend wurde sie herausgeschnitten. Zur Elution fand eine Vorrichtung Anwendung, die CONSDEN und Mitarbeiter (4) vorschlagen. In eine Wanne mit leicht angesäuertem Wasser wurde ein Bogen Filterpapier so eingelegt, dass ein kurzer freier Rand aus der Wanne ragte. An diesen Rand wurde durch Adhäsion die zur Elution bestimmten ausgeschnittenen Fraktionen angebracht, so, dass sie zu etwa 1 cm dem Filterpapier auflagen; das andere Ende der Streifen wurde spitz zugeschnitten. Ferner wurden an einem Gestell fein ausgezogene Kapillaren so befestigt, dass ihr unteres Ende in ein Reagenzglas ragte, in ihr

oberes Ende wurden die Spitzen der Papierstreifen, die das zu eluierende Material enthielten, gelegt. So kam es durch die kapillaren Kräfte zu einer gleichmässigen Durchspülung der Streifen mit dem Lösungsmittel, sodass sich das Elutionsmaterial an der Spitze sammelte und in die Reagenzgläser abtropfte. Zur Kontrolle der Elutionsgeschwindigkeit wurde ein bereits gefärbtes Streifchen gleicher Länge angebracht, dessen Entfärbung das Ende der Elution anzeigte. Nach voraussichtlicher Beendigung der Elution wurden die Streifchen zur Kontrolle gefärbt und zeigten durch eine negative Farbreaktion, dass sie völlig ausgewaschen waren. Diese Methode erwies sich vor allem dadurch als besonders günstig, dass mit geringen Mengen des Lösungsmittels eine maximale, gleichmässige Auswaschung erzielt wurde.

IV. Vorfraktionierung mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese:
Zur Elution und anschliessenden hydrolytischen Aufspaltung der Peptidfraktionen waren die aus Pherogrammen mit 2o% igem Extrakt (bezogen auf die Trockensubstanz) gewonnenen Mengen an Material in den einzelnen Banden zu gering. Höher konzentrierte Lösungen wiederum ergaben eine schlechte Auftrennung. So mussten Möglichkeiten gesucht werden, nur die gewünschten Fraktionen in höherer Konzentration in einer Lösung zu erhalten, die störenden, nicht benötigten Fraktionen mussten aus der Lösung entfernt werden. Eine Vorfraktionierung mit der trägerfreien Elektrophorese löste dieses Problem weitgehend. Gleichzeitig wurde der Extrakt durch diese Methode weitgehend entsalzt. Es wurde dazu eine von HANNIG (6) beschriebene Apparatur (Firma Bender & Hobein, München) benützt. Wir arbeiteten mit einem Acetatpuffer mit dem pH 3,6 bei einer Temperatur von 4 Grad Celsius. Die angelegte Spannung betrug 2,o5 KV, bei einem Strom von 16o mA die Durchflussgeschwindigkeit des Puffers 7 U/min.

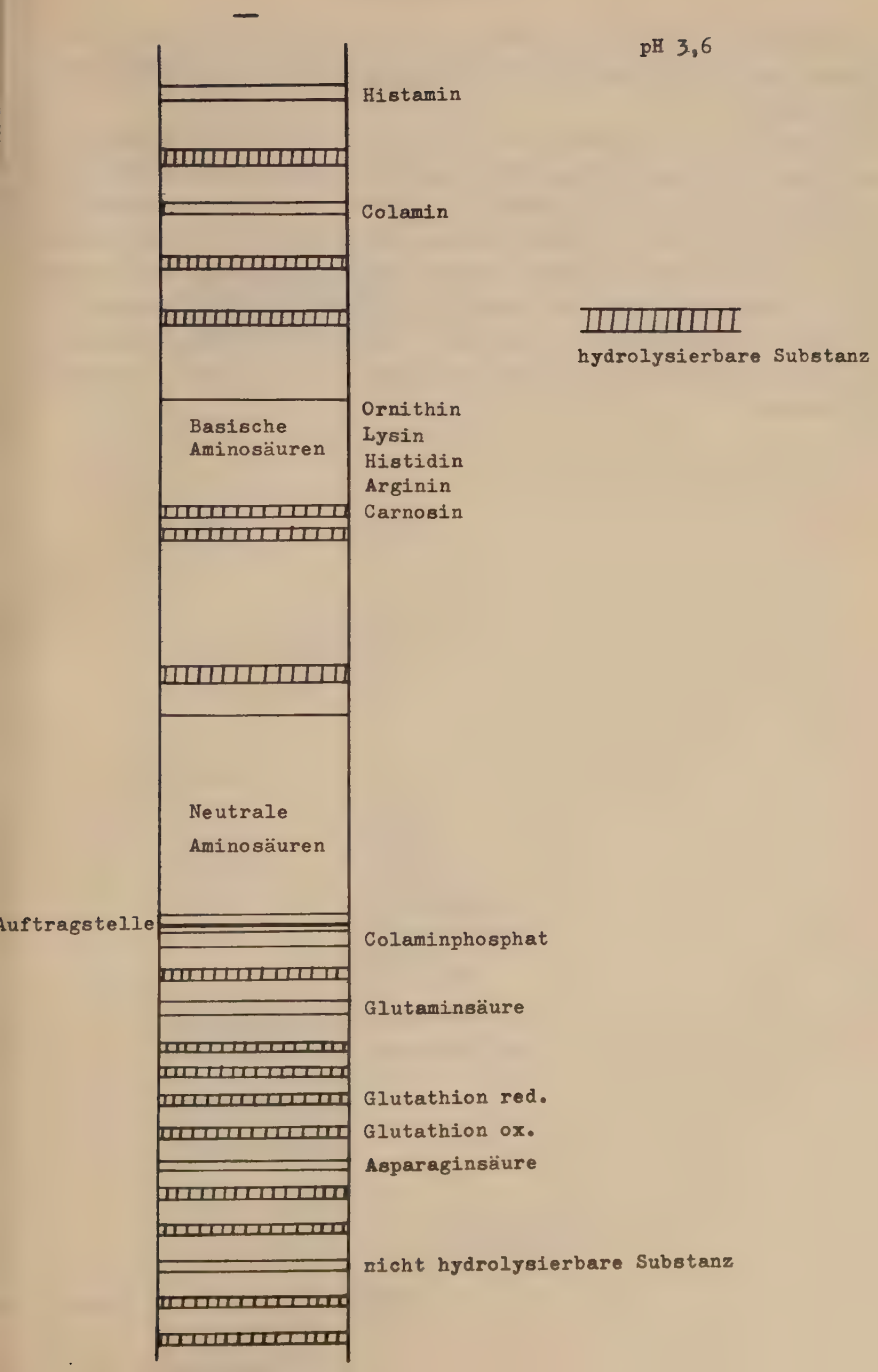
Zuerst wurde das Gerät nacheinander mit Asparaginsäure, Taurin und Lysin in gelöster Form als Grenzwerte für saure, neutrale und basische Aminosäuren beschickt, um die ungefähre Lokalisation und Wanderung der einzelnen Substanzen bei den oben angegebenen Bedingungen festzustellen. Nach dem Lauf wurde durch Färbung mit Ninhydrin bestimmt,in welchem der 48 Auffanggläser sich die Testsubstanz befand. Dann wurde bei gleichen Bedingungen die Maschine mit dem Extrakt beschickt. So konnte nun festgestellt werden, wo die einzelnen Komplexe lokalisiert waren. Zur Kontrolle wurde noch eine Probe von jedem 2. Glas zur hochspannungselek-

trophoretischen Trennung und zur Identifikation des Inhalts mittels Testsubstanzen entnommen. So fanden sich in den Gläsern 1 - 19 die sauren Bestandteile, von 2o - 24 der Komplex Asparaginsäure bis Glutaminsäure, in 31 - 39 die basischen und von 4o - 48 die Bestandteile, die weiter zur Kathode wandern als Lysin. Diese Fraktionen wurden nun lyophilisiert und die höher konzentrierten Trockensubstanzen luftdicht bei minus 15 Grad Celsius aufbewahrt. Von jeder der 5 Fraktionen wurden noch Vergleichspherogramme angefertigt. Dabei zeigte sich eine stärkere Anfärbung vorher nur wenig sichtbarer Substanzen.

Ergebnisse

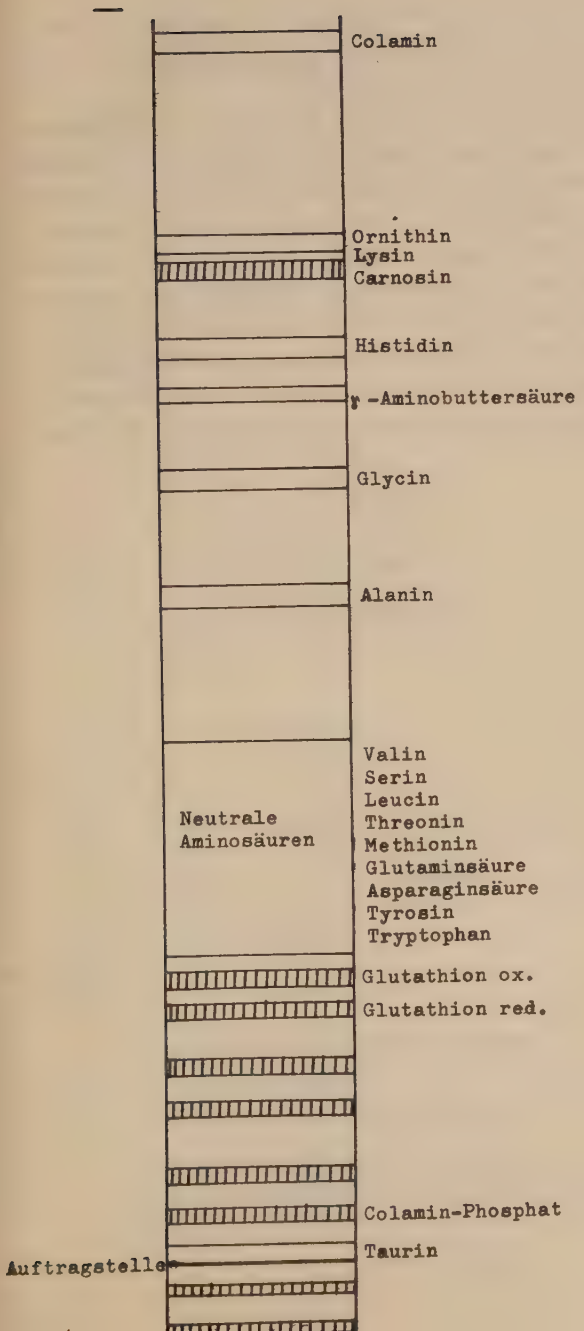
Zuerst stellte sich die Aufgabe, die Lage der hydrolysierbaren Fraktionen im Pherogramm zu bestimmen. Dazu wurden in einem Übersichtspherogramm mit dem als günstig befundenen Puffer von pH 3,6 nebeneinander sowohl normaler wie hydrolysierter Extrakt hochspannungselektrophoretisch getrennt. Es wurden mehrere Konzentrationen verwendet, nämlich 5%, 1o% und 2o% ige Extrakte (bezogen auf die Trockensubstanz), da sich gezeigt hatte, dass bei niederen Konzentrationen zwar die Trennung der einzelnen Fraktionen besser gelang, aber z.B. mit dem 2o% igen Extrakt Fraktionen, die nur in geringer Menge vorlagen, deutlicher anzufärben waren. Bei pH 3,6 wurden zwei Pherogramme angefertigt: Zur Darstellung der im sauren Bereich wandernden Fraktionen wurde eine Auftragstelle 15 cm von der Kathode gewählt und die Extrakte bei 4 KV und 8o mA 18o Minuten getrennt. Zur Auftrennung im basischen Bereich wurde eine Auftragstelle 2o cm von der Anode gewählt und das Pherogramm unter den Bedingungen 4 KV, 75 mA, 65 Minuten hergestellt. Mit Hilfe dieser beiden Pherogramme wurde folgende Übersicht gefunden (vergleiche Abbildung I):
Danach liegen im sauren Bereich zwei hydrolysierbare Substanzen zwischen Auftragstelle und der Fraktion Glutaminsäure. Bei der oberen der beiden handelt es sich, wie durch gleichzeitig aufgetragene Vergleichssubstanzen festgestellt werden konnte, um das Amin Äthanolamin-Phosphat (Colaminphosphat). Vier weitere hydrolysierbare Fraktionen liegen zwischen Glutaminsäure und Asparaginsäure. Während die beiden näher der Auftragstelle liegenden nicht identifiziert werden konnten, handelt es sich bei den beiden näher der Asparaginsäure um oxydiertes und reduziertes Glutathion. Anodisch der Asparaginsäure finden sich vier weitere Peptide in regelmässigen Abständen, zwischen deren beiden oberen und unteren sich eine nicht hydrolysierbare Fraktion befindet. Kathodenwärts finden sich unmittelbar nach dem Block der neutralen Aminosäuren eine hydrolysierbare Fraktion und unterhalb der basischen Aminosäuren, also unterhalb Arginin und Histidin, weitere zwei Peptide, deren oberes für Carnosin gehalten wurde. Kathodenwärts der basischen Aminosäuren folgen zwei weitere Peptide, auf die das Amin Äthanolamin (Colamin) folgt, welches mittels Vergleichssubstanzen identifiziert werden konnte. Hierauf folgt noch eine hydrolysierbare unbekannte Fraktion und schliesslich konnte die oberste Bande mittels Vergleichssubstanzen als Histamin identifiziert werden.

Abbildung I


pH 3,6
Histamin
Colamin
hydrolysierbare Substanz
Basische Aminosäuren
Ornithin
Lysin
Histidin
Arginin
Carnosin
Neutrale Aminosäuren
Auftragstelle
Colaminphosphat
Glutaminsäure
Glutathion red.
Glutathion ox.
Asparaginsäure
nicht hydrolysierbare Substanz

Auch beim Puffer mit pH 1,9 wurde eine Karte angelegt nach einem Pherogramm, das bei 6 KV und 5o mA 9o Minuten gelaufen war, (vergleiche Abbildung II).
Dabei zeigten sich anodenwärts der Auftragstelle zwei hydrolysierbare Fraktionen, zwischen Auftragstelle und Beginn des neutralen Blocks, also zwischen Taurin und Tryptophan, sechs hydrolysierbare Substanzen, von denen die der Auftragstelle am nächsten liegende als Colamin-Phosphat, die beiden oberen als Glutathion, reduziert und oxydiert, identifiziert wurden. Innerhalb der basischen Aminosäuren findet sich ein weiteres Peptid (Carnosin?), welches in manchen Pherogrammen von Histidin und Lysin überlagert wurde. Am weitesten kathodenwärts wandert das Colamin.

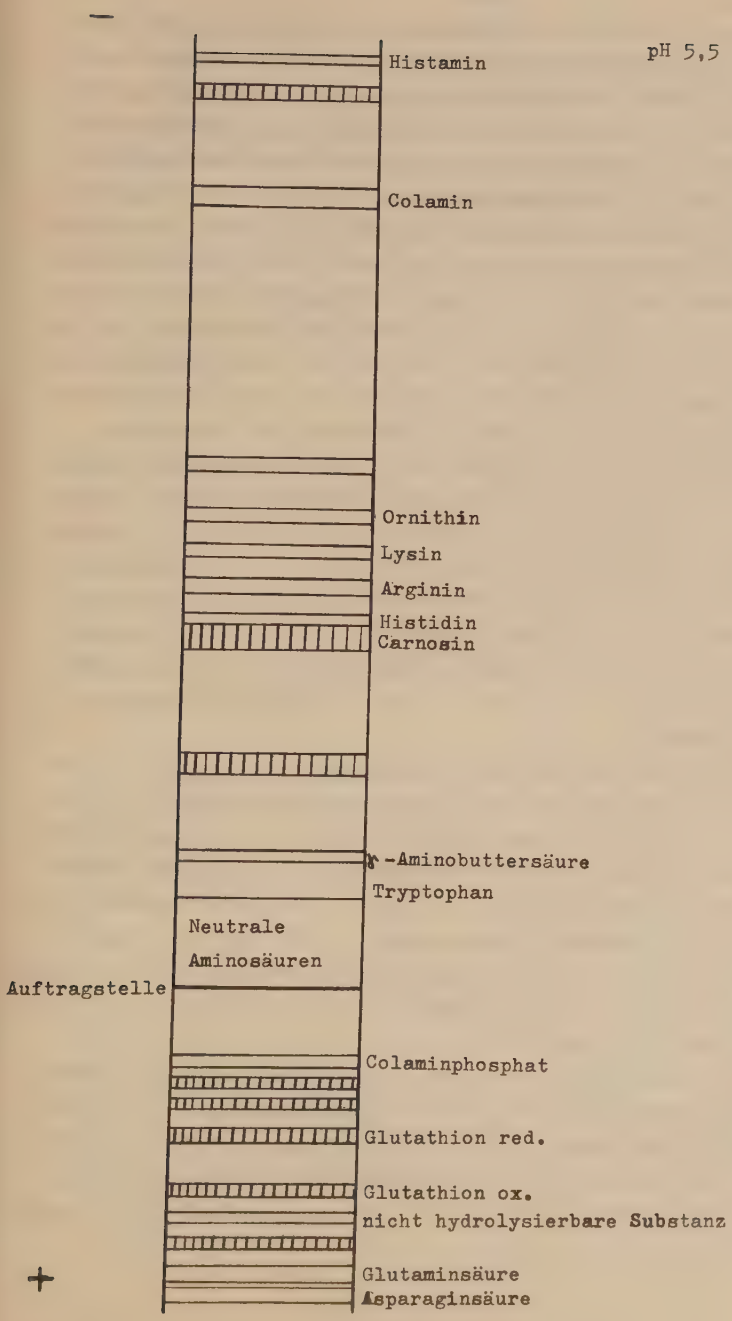
Abbildung II



Eine weitere Karte wurde nach Pherogrammen angelegt, die mit dem Pyridin-Acetat-Puffer (pH 5,5) bei 3 KV und 9o mA nach einer Laufzeit von 1oo Minuten entstanden (vergleiche Abbildung III).

Dabei zeigt sich anodenwärts der Auftragstelle Colamin-Phosphat, dem zwei Peptide folgen. Anschliessend finden sich die zwei Glutathione, und auf eine nicht hydrolysierbare Fraktion folgt ein weiteres Peptid. Die beiden darauf folgenden letzten Bande sind Glutaminsäure und Asparaginsäure. Kathodenwärts finden sich zwischen Neutralen und Basischen, also Gamma-Aminobuttersäure und Histidin, zwei hydrolysierbare Fraktionen, von denen die oberste Carnosin sein könnte. Auf die am weitesten wandernde basische Aminosäure, also das Ornithin, folgt eine nicht hydrolysierbare unbekannte Bande, der sich Colamin, eine hydrolysierbare Substanz und am weitesten kathodenwärts das Histamin anschliessen.

Abbildung III



Die Identifikation einiger Amine gelang dadurch, dass im Extrakt vermutete Substanzen dieser Art dem Pherogramm in reiner Form als Testsubstanzen zugefügt wurden. Teilweise wurden sie zwischen zwei Extrakten aufgetragen, teilweise überlappend, also so, dass ihre Auftragsstellen in die der Extrakte hineinreichten. Als sehr gut erwies sich auch die Methode, die einzelnen Testsubstanzen über dem Extrakt aufzutragen und durch eine Verstärkung der bestreffenden Bande im Vergleich zum reinen Extrakt das Vorhandensein der Substanz zu sichern. Auf diese Weise wurden Colamin, Colaminphosphat und Histamin dargestellt. Ebenso gelang es auf diese Weise, aus der Reihe der Peptidfraktionen reduziertes und oxydiertes Glutathion nachzuweisen. Bei letzterem war es sehr wichtig, dass sowohl Testsubstanz wie auch Extrakt erst unmittelbar vor dem Auftragengelöst wurden, da sie an der Luft in kürzester Zeit oxydierten.

Die Anwesenheit von Carnosin schien aus mehreren Gründen wahrscheinlich. So lief im Pherogramm die Vergleichssubstanz genau bis zu einer Stelle, wo im Extrakt eine hydrolysierbare Substanz lag. Andererseits ergab diese hydrolysierbare Bande, wie auch die Testsubstanz, mit der KNI-Färbung eine charakteristische Blaufärbung, während sämtliche übrige Fraktionen sich in üblicher Weise rot anfärbten. Zur Sicherung der Identifikation und zur Erprobung der Möglichkeit einer Peptidaufklärung mit der HE sollte die Fraktion, die die fragliche Substanz enthielt, eluiert werden.

Mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese gelang es uns, Material zu erhalten, das bei der anschliessenden hochspannungselektrophoretischen Verarbeitung trotz hoher Konzentrationen in den gesuchten Fraktionen bei einer Trenndauer von 12o- 15o Minuten ausgezeichnete Trennergebnisse zeigten. Die gesuchte Fraktion wurde in der beschriebenen Weise eluiert, dann im Säureüberschuss hydrolysiert. Eine Probe des Eluats wurde entnommen und zeigte auf dem angefertigten Pherogramm eine einzige, in Wanderungsgeschwindigkeit und Anfärbung der Testsubstanz, dem reinen Carnosin, entsprechende Bande.

Anschliessend wurde das hydrolysierte Eluat hochspannungselektrophoretisch getrennt. Dabei traten sechs ninhydrinpositive Fraktionen auf. Die beiden kathodennahen Fraktionen wurden als Histidin und ß-Alanin identifiziert. Dies gelang durch Vergleichspherogramme mit den beiden Reinsubstanzen, und speziell bei ß-Alanin dadurch, dass sich eine eigenar-

tige Grünfärbung bei der KNI-Färbung zeigte, die sonst bei keiner anderen Fraktion auftrat. Die vier weiteren Fraktionen konnten ebenfalls mittels Testsubstanzen als Alanin, Glycin, Valin und Leucin identifiziert werden. Die beiden Carnosinbestandteile ß-Alanin und Histidin wurden allerdings in erheblich höheren Konzentrationen gefunden. Auf Grund dieser Tatsachen, sowie unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Beobachtungen wie Wanderungsgeschwindigkeit und Färbung schien die Identifikation von Carnosin im Herzmuskelextrakt des Kalbes weitgehend gesichert. Bezüglich der vier weiteren gefundenen Fraktionen wird auf die Diskussion verwiesen.

Gegenüberstellung von Herz- und Skelettmuskel

Mit den bisher gewonnenen Ergebnissen gingen wir daran, einen Vergleich der "Organspektren" der Ultrafiltrate von Herzmuskel und Skelettmuskel anzustellen. Unsere Ausgangsmaterialien waren einmal Herzmuskel vom Kalb und Kaninchen, zum zweiten ein Extrakt vom musculus psoas des Kaninchens. Um diese Vergleiche zu erhalten, wurden die drei Extrakte sowie ihre Hydrolysate unter den gleichen Bedingungen, d.h. also jeweils auf einem Pherogramm aufgetrennt. Dabei ergab sich zunächst, dass Kalbs- und Kaninchenherz zumindest qualitativ in ihren Fraktionen völlig übereinstimmen, weshalb auch nur in einer der folgenden Abbildungen alle drei Pherogramme aufgezeichnet sind. Der Skelettmuskel enthält alle nicht hydrolysierbaren Fraktionen, die auch im Herzmuskel enthalten sind, wobei allerdings Prolin auffallend vermehrt und Glutaminsäure stark vermindert erscheint. Das Colamin fehlt im Psoas. Unterschiede treten bei den hydrolysierbaren Fraktionen auf. Sie wurden für die einzelnen Pherogramme bei verschiedenem pH in Vergleichskarten festgehalten.

pH 1,9: (siehe Abbildung IV)

Die beiden Peptide im sauren Bereich treten beim Psoas nicht auf, ebenso fehlt eine Fraktion, die bei den nicht hydrolysierten Herzextrakten anodisch des reduzierten Glutathions erscheint. Dagegen findet sich im Psoas unmittelbar über dem Alanin eine Bande, die sich bei der KNI-Färbung braun anfärbt. und bei der Hydrolyse verschwindet. Die Carnosinbande im Psoas ist stark verbreitert, bei der Hydrolyse tritt eine breite ß-Alaninbande auf.

pH 3,6: (siehe Abbildung V)

Diese Karte wurde aus Pherogrammen zusammengestellt, deren eines der Auftrennung im sauren Bereich diente, während das andere ein normales Übersichtspherogramm darstellt. Es fehlen im Psoas die bei längerem Lauf des Herzmuskelextraktes im sauren Bereich auftretenden vier Fraktionen sowie die Bande unmittelbar über dem Block der neutralen Aminosäuren. Dafür zeigt er etwa in der Mitte zwischen den Neutralen und dem Carnosin wieder eine braun gefärbt Bande (KNI-Färbung). Unter dem Carnosin fehlt die im Herzmuskelpherogramm enthaltene

Fraktion, Carnosin ist wieder stark verbreitert und ergibt im Hydrolysat die breite ß-Alaninbande. Über dem Ornithin enthält der Herzextrakt eine Bande, die im Psoas nicht auftritt.

pH 5,5: (siehe Abbildung VI)

Im sauren Bereich fehlen im Psoas zwei Fraktionen zwischen Colaminphosphat und reduziertem Glutathion. Es tritt wieder die braune Bande zwischen neutralen und basischen Aminosäuren auf, während die Fraktion unter dem Carnosin nicht erscheint. Carnosin ist wieder stark verbreitert, im Hydrolysat eine breite ß-Alaninbande.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Skelettmuskel kein Colamin enthält, das Colaminphosphat jedoch aufweist. Weiterhin tritt im Skelettmuskel eine hydrolysierbare Bande auf, die etwa zwischen neutralen und basischen Aminosäuren liegt und mit der KNI-Färbung eine charakteristische Braunfärbung ergibt. Die Carnosinbande ist im Skelettmuskel wesentlich stärker, was sich nach Hydrolyse in einer sehr starken ß-Alaninbande ausdrückt. Diese Carnosinbande überlagert im Skelettmuskel möglicherweise eine hydrolysierbare Substanz, die im Herzmuskel ziemlich nahe dem Carnosin in Richtung Auftragstelle liegt. Weiterhin fehlen im Skelettmuskel die vier hydrolysierbaren Banden, die beim Herzmuskel im stark sauren Bereich liegen. In der Zusammensetzung der Aminosäuren stimmen Herzmuskel und Skelettmuskel zumindest qualitativ überein.

Abbildung IV

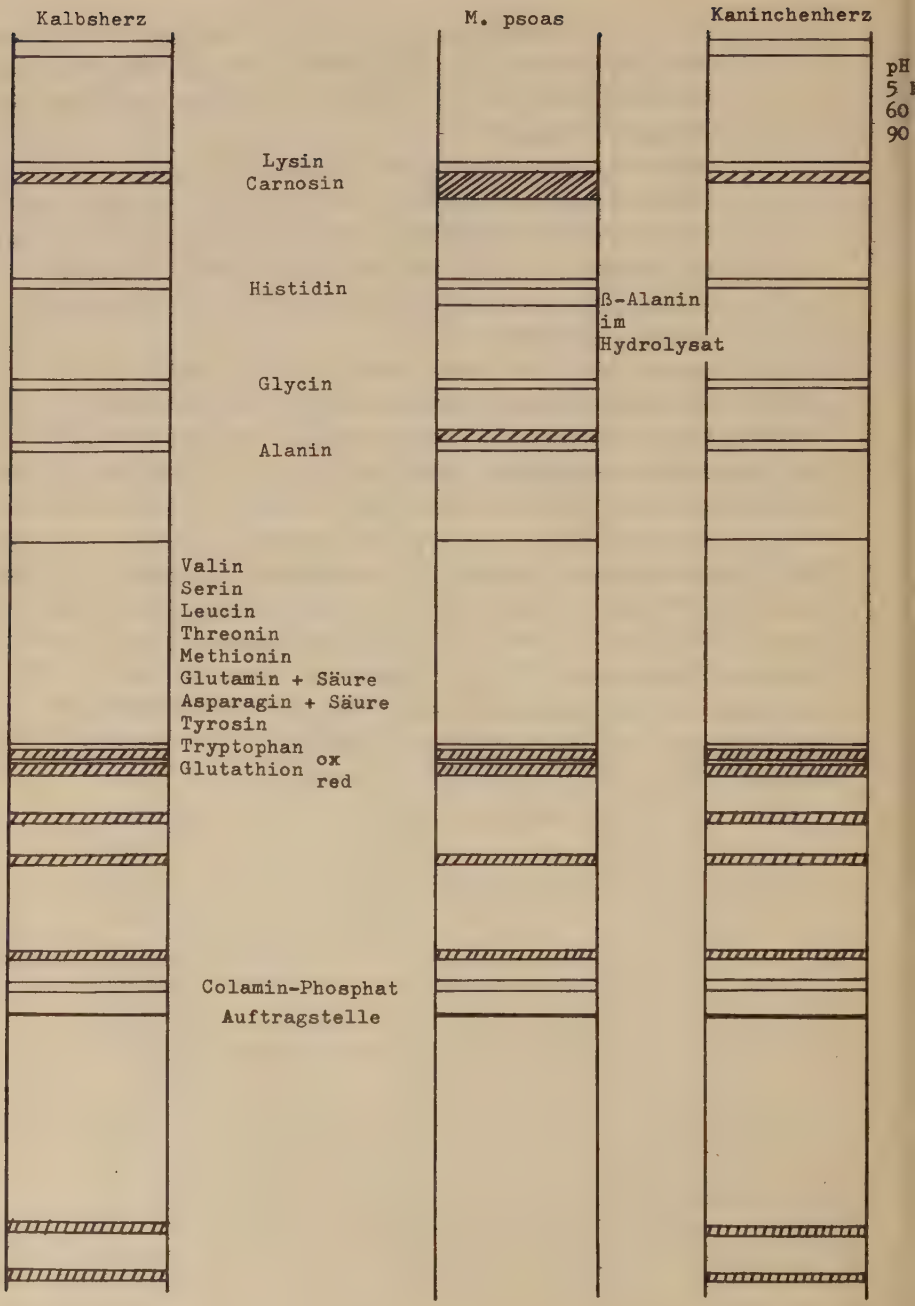


Abbildung V

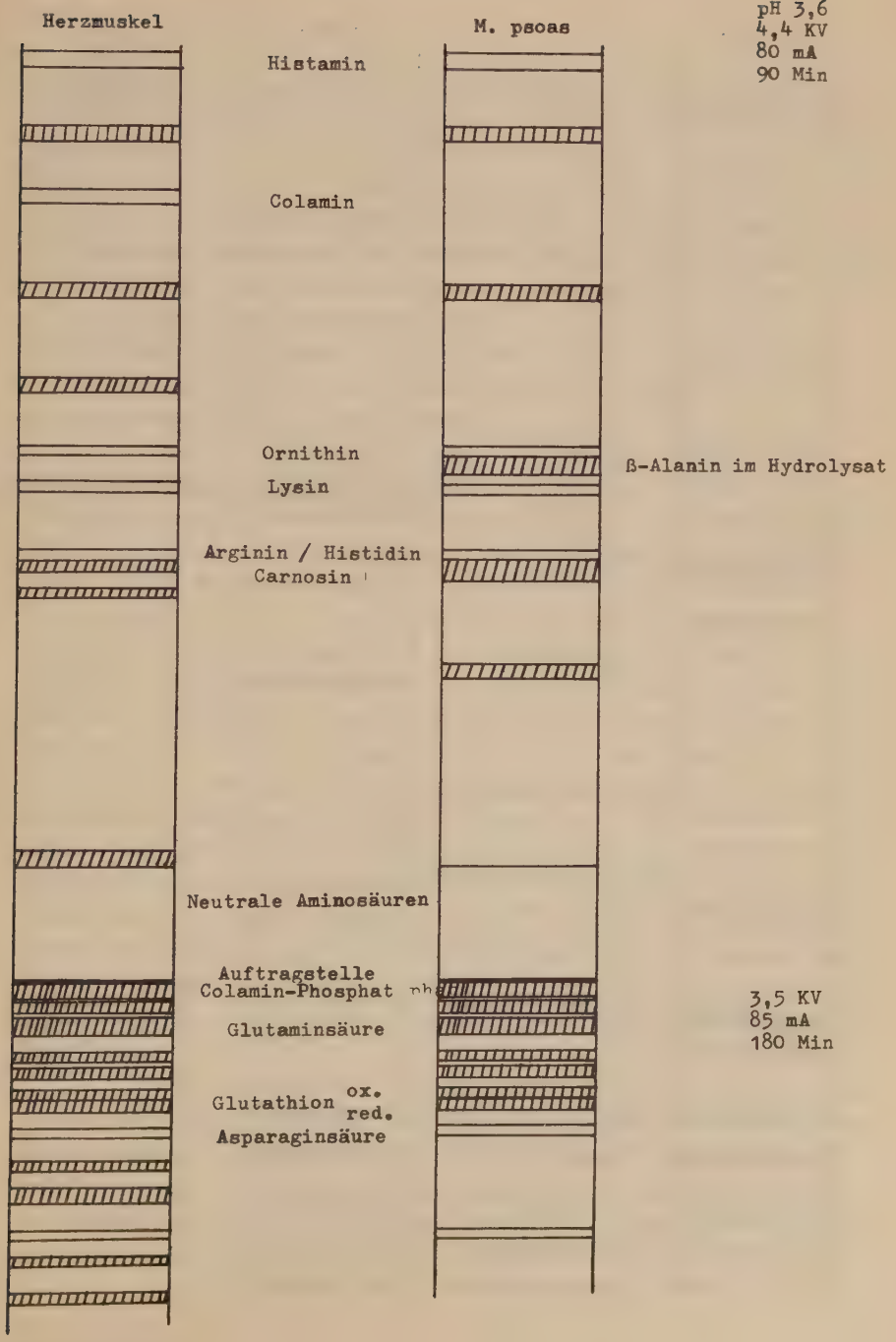
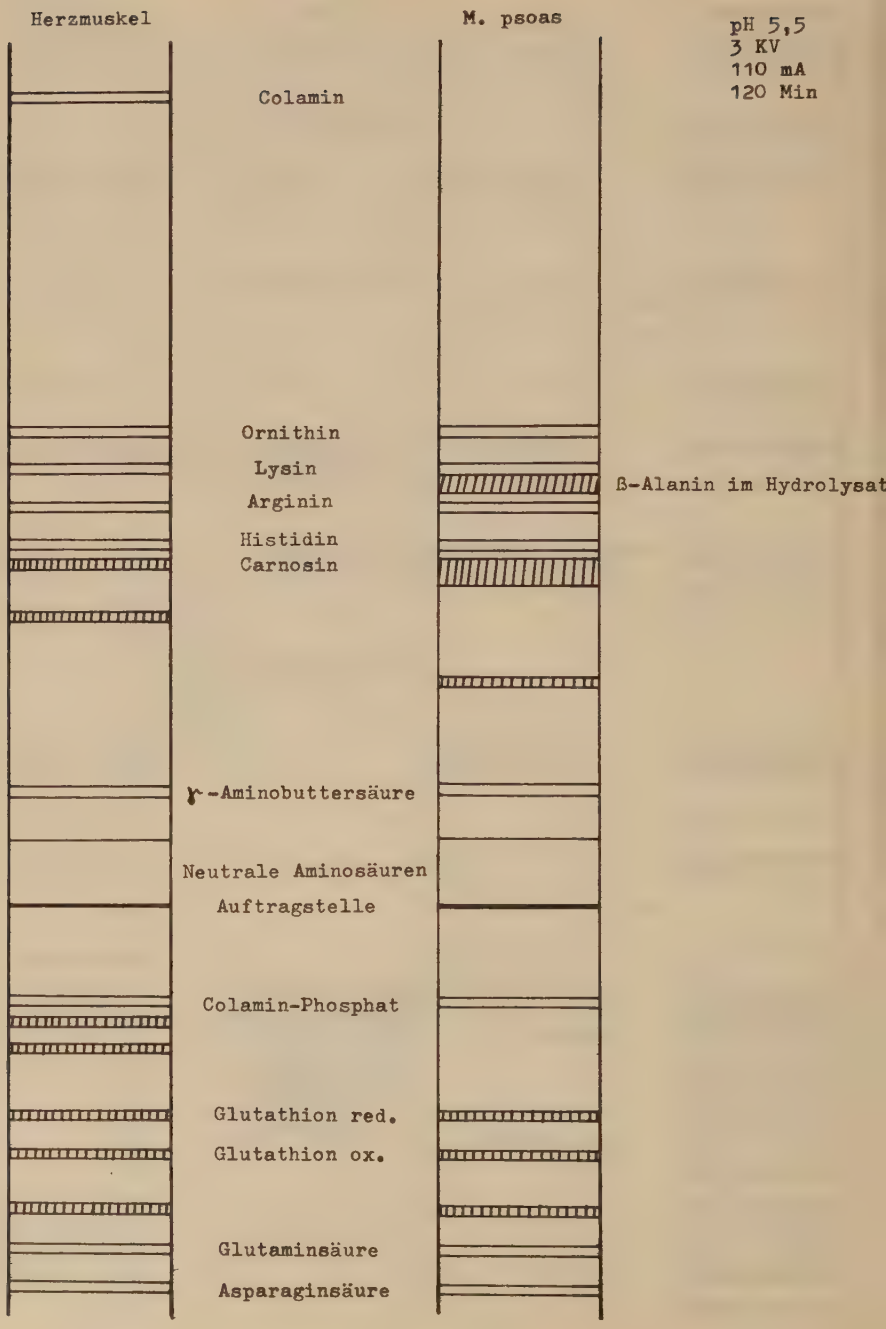

Herzmuskel
M. psoas
pH 3,6
4,4 KV
80 mA
90 Min
Histamin
Colamin
Ornithin
Lysin
ß-Alanin im Hydrolysat
Arginin / Histidin
Carnosin
Neutrale Aminosäuren
Auftragstelle
Colamin-Phosphat
Glutaminsäure
3,5 KV
85 mA
180 Min
Glutathion ox.
red.
Asparaginsäure

Abbildung VI



Diskussion

Es ist ziemlich schwer, einen Vergleich der Ergebnisse unserer Untersuchungen mit denen anderer Untersucher anzustellen. Während sich die meisten Arbeiten in erster Linie nur mit den freien Aminosäuren in den verschiedenen Geweben befassen und die auftretenden hydrolysierbaren Substanzen nur als Nebenergebnisse behandeln, richteten wir unser Hauptaugenmerk gerade auf die Fraktionen, die nach der Identifikation der Aminosäuren noch unaufgeklärt waren. Ausserdem arbeiten die anderen Untersucher zumeist mit den Methoden der Chromatographie und der ein- und zweidimensionalen Elektrophorese, sodass es zumindest sehr schwierig ist, die erstellten sogenannten "Organspektren" mit den von uns gefundenen Karten zu vergleichen.

Ohne Zweifel gestattet unsere Methode eine gute Trennung von freien Aminosäuren und anderen im elektrischen Feld wandernden Substanzen, wie Oligopeptiden und biogenen Aminen. Durch den Vergleich vor und nach der Hydrolyse können wir den Sitz hydrolysierbarer Fraktionen im Pherogramm bestimmen. So fanden wir als Ergebnis unserer Untersuchungen die Identifikation der biogenen Amine Colamin, Colaminphosphat und Histamin, sowie die niederen Peptide Glutathion, und zwar in seiner oxydierten und reduzierten Form, und Carnosin. Daneben konnten wir im Pherogramm weitere 12 hydrolysierbare Fraktionen lokalisieren (siehe Abbildung I), wenngleich auch nicht identifizieren.

Die meisten der unbekannten Fraktionen finden sich im Gebiet der saueren Aminosäuren. Auf diese Tatsache weist auch BISERTE (1) bei seinen Untersuchungen hin, die er allerdings speziell an Lebern, aber auch mit anderen Organen durchführte. Er findet im Gebiet der Dicarboxylaminosäuren und der sogenannten 'Gamma - Aminosäuren', d.h. der leicht basischen Aminosäuren, "zahlreiche Peptide", doch gelingt auch ihm keine genauere Identifikation. Auch bei TJUTCEV (11) finden sich in diesem Gebiet 19 allerdings teilweise sehr ähnliche bzw. identische Fraktionen.

Bei einer Übersicht über den Gehalt der freien Aminosäuren im Gewebe der Ratte findet BISERTE (1) kein Glutathion, während er es im Schweinemuskel, ebenso wie wir beim pH 3,6, zwischen Asparaginsäure und Glutaminsäure lokalisieren kann. In der selben Gegend finden wir allerdings noch zwei weitere Peptide. BISERTE (1) weist jedoch in seiner Arbeit darauf hin, dass gerade der Gehalt an Glutathion im besonde-

ren Masse von der Art der Extraktion und der Präparation der Extrakte abhängt. TJUTCEV (11) findet in einer Fraktion, die beim pH 3,5 allerdings weiter anodenwärts als die Asparaginsäure liegt, nach weiterer Aufarbeitung sechs Unterfraktionen, von denen eine dem Glutathion entspricht. Auch WACHOLDER (13) findet Glutathion im menschlichen Muskelgewebe, und zwar in einer Konzentration von 7o mg% und 93 mg%. Nach unserer Auffassung findet sich das Glutathion in seiner oxydierten und reduzierten Form im frischen Herzmuskelextrakt sowie im Skelettmuskel in zwei deutlich voneinander getrennten, unmittelbar benachbarten Banden bei allen drei verwendeten Puffergemischen. Die beste Trennung ergibt sich bei pH 5,5.

Auf das Vorkommen von Carnosin im Herzmuskel der Ratte weist BISERTE (1) nicht besonders hin, es ist jedenfalls in der Aufstellung der von ihm gefundenen Substanzen nicht aufgeführt. Dagegen findet er wie wir nach Hydrolyse eine Fraktion ß-Alanin, und zwar in der Menge 2 mg/1oo g frischen Gewebes, die vorher nicht festzustellen war. Im Skelettmuskel vom Schwein weist er jedoch auf das Vorkommen von Carnosin hin. Auch in der Arbeit von TJUTCEV (11) findet sich kein Hinweis auf das Carnosin.

Auf Grund unserer Untersuchung glauben wir, die Identifikation des Carnosin als gesichert annehmen zu können. Färbung und Wanderungsgeschwindigkeit stimmen mit der reinen Testsubstanz überein. Allerdings bedarf es noch einer Klärung der nach der Hydrolyse aufgetretenen sechs Fraktionen, auf die bereits hingewiesen wurde. Es handelt sich dabei um die Carnosinbestandteile Histidin und ß-Alanin, sowie um die Aminosäuren Alanin, Glycin, Valin und Leucin, die allerdings kaum sichtbare Banden ergaben. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Fraktionen um Verunreinigungen des verwendeten Filterpapieres. CLOTTEN (3) weist darauf hin, dass die Papiere Verunreinigungen von Peptidcharakter enthalten, die sich bei der Elution besonders störend bemerkbar machen, wenn der weiteren Verarbeitung der Eluate eine Hydrolyse vorausgeht. Das erklärt auch, dass unser Eluat vor der Hydrolyse nur eine einzige Bande im Pherogramm ergab. WYNN (14) konnte bei der Untersuchung dieser peptidähnlichen Verunreinigungen nach Hydrolyse Asparaginsäure, Cysteinsäure, Glutaminsäure, Glycin, Prolin und mit Wahrscheinlichkeit Alanin, Valin, Leucin, Arginin und Tyrosin nachweisen. Nach STROH (1o) enthält das Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2o43 b, das auch von uns bei den beschriebenen Versuchen verwendet wurde, 1o - 17 mg Stickstoff / 1oo g. Er fand nach Hydrolyse min-

destens sieben Aminosäuren, darunter Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Glycin, Valin, Leucin oder Isoleucin. Da gerade diese vier letzteren mit den bei uns nach der Hydrolyse des Carnosin zusätzlich aufgetretenen Fraktionen übereinstimmen, kann darauf geschlossen werden, dass es sich hierbei um Verunreinigungen des Papieres handelt. Die Möglichkeit, dass das Carnosin ein zweites Peptid mit der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit überlagert, welches als Bestandteile diese vier Aminosäuren enthält, ist zwar nicht ausgeschlossen, erscheint aber ziemlich unwahrscheinlich.

Allerdings stehen wir mit der Identifikation des Carnosins im Gegensatz zu anderen Autoren, die das Vorkommen dieser Substanz im Myokard ausdrücklich verneinen. Dagegen wird es im Skelettmuskel übereinstimmend gefunden. Auf diese Tatsache weist auch G. SCHMIDT (9) hin, der im Herzmuskelfiltrat weder Carnosin und Anserin noch nach der Hydrolyse ß-Alanin findet. Seine Untersuchungen erstrecken sich auf die linken Ventrikel der verschiedenen Vertebratenspezies. In den Skelettmuskeln derselben Spezies findet er deutliche Mengen Carnosin.

Auch REDDY (7) weist darauf hin, dass er Carnosin im Herzmuskel nicht finden konnte. Dagegen findet er deutlich messbare Mengen in Magenwand und Leber, vor allem aber im Zwerchfell und Pectoralismuskel der Ratte. Nach seiner Ansicht verhält sich die Konzentration an Carnosin in einem Gewebe reziprok zu seinem Sauerstoffverbrauch. Interessant erscheint aber auch, dass er im Muskelextrakt kein freies Histidin findet. Bei unseren Untersuchungen fand es sich sowohl im Herz- wie im Skelettmuskel auch vor der Hydrolyse.

Bestätigt wird dagegen das Vorkommen von Carnosin im Herz- und Skelettmuskel von DU VIGNEAUD (12), allerdings im Skelettmuskel in fast doppelter Konzentration. Doch differieren die von ihm zitierten Autoren sehr stark in ihren quantitativen Angaben. Das Vorkommen von Anserin verneint er; auch bei unseren Untersuchungen fand sich kein Anhalt für sein Vorkommen im Herz- oder Skelettmuskel.

BISERTE (1) findet im Herzen nach Hydrolyse eine Zunahme an Sarkosin von o auf o,5 mg/1oo g frischen Gewebes. Im Gegensatz dazu konnten wir Sarkosin weder vor noch nach Hydrolyse auf unseren Pherogrammen identifizieren.

Von den drei von uns gefundenen Aminen, nämlich Colamin, Colaminphosphat und dem Histamin, erwähnt BISERTE (1) in seiner Aufstellung

nur das Colamin. Er findet eine Zunahme nach der Hydrolyse von 1,8 auf 3,9 mg/1oo g frischen Extrakt, was nach unseren Ergebnissen wohl auf die Abspaltung des Phosphats vom Colaminphosphat bei der Hydrolyse zurückzuführen ist. Bei unseren Pherogrammen war nach der Hydrolyse das Colaminphosphat völlig verschwunden, die Bande des Colamin dagegen wesentlich verstärkt.

Andere Amine wie das Serotonin, Dopamin, Butyrylcholin und Tyramin konnten wir in unseren Pherogrammen nicht nachweisen; bein Acetylcholin ergab sich keine Färbung mit Ninhydrin, sodass wir eine weitere Untersuchung als nicht zu unserer Aufgabenstellung gehörend unterliessen. Zum Nachweis der von M. BÜRGER (2) erwähnten stickstoffhaltigen Extraktivstoffe im Muskel, nämlich Kreatin, Hypoxanthin, Xanthin, Guanin, Adenylsäure und Phosphagen eignet sich unsere Methodik nicht.

Bei unserem Vergleich von Herzmuskel vom Kalb und Kaninchen kommen wir wie TJUTCEV (11), der Ratten- und Schafsherz vergleicht, zu dem Ergebnis, dass beide in ihren Peptidfraktionen zumindest qualitativ übereinstimmen. Dagegen weicht der Skelettmuskel deutlich in seiner Peptidzusammensetzung vom Herzmuskel ab. Vor allem scheint das Carnosin im Skelettmuskel erheblich verstärkt, allerdings nach unserer Ansicht stärker, als DU VIGNEAUD (12) erwähnt.

Abschliessend sei noch auf einige Tatsachen hingewiesen, die die Anwendungsmöglichkeit unserer Methodik etwas einschränken. So besteht eine Hauptschwierigkeit darin, dass auch bei bester Auftrennung mit der eindimensionalen Hochspannungselektrophorese nicht mit Sicherheit eine gleich wandernde überlagerte Fraktion ausgeschlossen werden kann.

Ausserdem gibt unsere Methode nicht die Möglichkeit, die Aminosäuresequenz von Peptiden aufzuklären, sondern kann nur die qualitativen Bestandteile der Peptide nach Hydrolyse aufzeigen.

Daneben muss immer in Betracht gezogen werden, dass bei der Elution Aminosäuren aus den Papierbestandteilen ins Eluat gelangen können und so die Ergebnisse verfälschen. Durch quantitative Bestimmungen könnte diese Fehlerquelle ausgeschloseen werden.

Zusammenfassung

Es wird eine Trennung der ninhydrinpositiven freien Substanzen im Herzmuskelextrakt des Kalbes und im Herzmuskel- und Skelettmuskelextrakt des Kaninchens vorgenommen. Dazu wird die Hochspannungselektrophorese angewendet bei drei Puffergemischen. Von den Ergebnissen der Pherogramme werden vor und nach der Hydrolyse der Extrakte Karten angelegt. Durch den Vergleich können die hydrolysierbaren Substanzen lokalisiert werden.

Die Identifikation einiger Amine und Oligopeptide geling teils durch Testsubstanzen, beim Carnosin darüberhinaus durch Elution und weitere Auftrennung des hydrolysierten Eluats. Es können Colamin, Colaminphosphat und Histamin, sowie oxydiertes und reduziertes Glutathion identifiziert werden. Ferner werden 12 weitere hydrolysierbare Fraktionen lokalisiert.

Weiter werden die "Organspektren" der hydrolysierbaren, ninhydrinpositiven Bestandteile von Herz- und Skelettmuskel mittels angefertigter Karten verglichen.

Literaturverzeichnis

1. BISERTE, G., P. BOULANGER, P. PAYSANT
Chromatographie sur Papier des Acides Aminees et Polypeptides des Milieux biologiques.
Bull. soc. chim. biol. (1958) 2o67

2. BÜRGER, M. Pathol. Physiologie (1958) 25

3. CLOTTEN R. und A.Hochspannungselektrophorese
(1962) 39 Verlag G. Thieme Stuttgart

4. CONSDEN R., A.J.P.MARTIN, A.H. GORDON, R.L.M. SYNGE
Ionophoresis in Silica Jelly. A Method for the Separation of Amino-Acids and Peptides.
Biochem. J. 4o (1946) 33

5. GUGLIELMONE A.E.R.DE, C.J. GOMEZ
Free amino acids in different Areas of rat brain.
Acta physiol. lat.-amer. 16 (1966) 26

6. HANNIG K. Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung.
Z. analyt. Chem. 181 (1961) 244

7. REDDY W.J., D.M. HEGSTED
The Measurement on Distribution of Carnosine in the Rat.
J. Biol. Chem. 237 (1962) 7o5

8. REES M.W. The Estimation of Threonine and Serine in Proteins.
Biochem. J. 4o (1946) 632

9. SCHMIDT G., R. CUBILES
Comparative Studies on the Occurence of the Carnosine-Anserine Fraktion in Skeletal Muscle and Heart.
Arch. Biochem. 58 (1955) 227

1o. STROH H.H. Untersuchungen über den Gehalt an nicht auswaschbaren N-Substanzen in Papiersorten für die Papierchromatographie.
Pharmazie 11 (1956) 473

11. TJUTCEV N., P. MÄSIAR
The Metabolism of Protein Substances in Muscle Tissue. A Study of Ninhydrinpositive Substances Isolated

from Nonprotein Extracts from the Heart of Normal Rats.
Physiol. Bohem. 13 (1964) 565

12. VIGNEAUD DU V., O.K. BEHRENS
Carnosine and Anserine.
Ergebn. Physiol. 41 (1939) 917

13. WACHOLDER K., W. QUENSEL
Glutathiongehalt und Leistungsfähigkeit der Muskeln.
Pflügers Arch. 235 (1935) 7o

14. WYNN V. A Peptide-like Containement of Filter Paper.
Nature (London) 164 (1949) 445

Herrn Professor Dr. H. Nowy möchte ich aufrichtig danken für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt gleichzeitig auch dem Leiter der Medizinischen Poliklinik der Universität München, Herrn Professor Dr. W. Seitz, an dessen Klinik ich den experimentellen Teil meiner Arbeit durchführen durfte.

LEBENSLAUF

Am 9. April 1942 wurde ich, Siegfried Franz-Xaver Donhauser, als jüngeres von zwei Kindern des prakt. Arztes Dr. Walter Donhauser und seiner Ehefrau Dr. Wiltrud Donhauser, geb. Beck, in München geboren.

Vom Herbst 1948 bis zum Februar 1949 besuchte ich die Volksschule in München, anschliessend bis Juli 1952 die Volksschule in Oberwarngau/Obb. Im Herbst 1952 trat ich in das Gymnasium in Tegernsee ein, wo ich im Juni 1961 das Abitur bestand.

Vom Wintersemester 1961/62 an war ich 11 Semester an der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeschrieben. Dort bestand ich am 23. Oktober 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 27. April 1964 die ärztliche Vorprüfung und am 3. August 1967 die ärztliche Prüfung.

Vom September 1967 bis Mai 1968 war ich als Medizinalassistent auf der chirurgischen Abteilung des St.Corneliushospitals in Dülken/Rhld. tätig, seit Juni 1968 bin ich auf der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung der Kreiskrankenhäuser in Mühlacker und Maulbronn/Wttbg. als Medizinalassistent beschäftigt.